

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-168869

(43)Date of publication of application : 14.06.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

(21)Application number : 2000-369684

(71)Applicant : SUMITOMO CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 05.12.2000

(72)Inventor : MIKAMI TOSHIYUKI
YANAGI KAZUNORI

(54) METHOD FOR DETERMINING AMINO ACID SEQUENCE OF PEPTIDE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for efficiently determining a sequence of amino acids of peptide.

SOLUTION: The method for determining the sequence of amino acids of peptide includes (1) a process of deuterium labeling an N terminal amino group of the peptide, (2) a process of obtaining a mass spectrum of fragment ions for the deuterium labeled peptide, and (3) a process of specifying data originating from the N terminal amino group of the peptide and data originating from a C terminal carboxyl group from the mass spectrum data obtained in the process (2), analyzing a sequence of amino acids of each data, and determining the sequence of amino acids of the peptide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-168869

(P 2 0 0 2 - 1 6 8 8 6 9 A)

(43) 公開日 平成14年6月14日(2002. 6. 14)

(51) Int. Cl. ⁷

G01N 33/68

識別記号

F I

G01N 33/68

テーマコード

(参考)

2G045

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2000-369684(P 2000-369684)

(22) 出願日 平成12年12月5日(2000. 12. 5)

(71) 出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 三上 寿幸

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(72) 発明者 柳 和則

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(74) 代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外 2 名)

Fターム(参考) 2G045 AA34 BB01 BB46 BB50 BB51

DA36 DA54 FA40 FB20

(54) 【発明の名称】 ペプチドのアミノ酸配列の決定方法

(57) 【要約】

【課題】 ペプチドのアミノ酸配列を効率的に決定する方法を提供する。

【解決手段】 (1) ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(2) 該重水素標識化ペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得する工程及び、(3) (2)の工程で得られた質量スペクトルデータからペプチドのN末端アミノ基由来データおよびC末端カルボキシル基由来データを特定し、それぞれのアミノ酸配列を解析し、ペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするペプチドのアミノ酸配列の決定方法。。

【特許請求の範囲】

【請求項1】(1) ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(2) 該重水素標識化ペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得する工程及び(3) (2)の工程で得られた質量スペクトルデータからペプチドのN末端アミノ基由来データおよびC末端カルボキシル基由来データを特定し、それぞれのアミノ酸配列を解析し、ペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするペプチドのアミノ酸配列の決定方法。

【請求項2】ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程が、ペプチドに、pH5以下で一般式〔1〕



(式中、 R^1 はアルキル基を表わす。但し、 R^1 における水素原子の少なくとも1個は重水素原子で置換されている。)で示される重水素カルボン酸無水物と一般式

〔2〕



(式中、 R^2 はアルキル基を表わす。但し、 R^2 における水素原子は重水素原子で置換されていない。)で示される軽水素カルボン酸無水物との混合物を作用させるか、pH6以下で一般式〔3〕



(式中、 R^3 は置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、 R^3 における水素原子の少なくとも1個は重水素で置換されている。)で示される重水素イソシアネート化合物と一般式〔4〕



(式中、 R^4 は置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、 R^4 における水素原子は重水素原子で置換されていない。)で示される軽水素イソシアネート化合物との混合物を作用させる工程である請求項1に記載の方法。

【請求項3】ペプチドとして、(1)の工程に先立ちSアルキル化処理されたものを用いる請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】ペプチドとして、タンパク質の切断により得られたものを用いる請求項1～3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ペプチドのアミノ酸配列の決定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】タンパク質のアミノ酸配列の決定は、タンパク質の構造を確認、同定する手段として重要である。タンパク質やペプチドのアミノ酸配列決定を行う方

法として一般的にエドマン分解法が用いられているが、最近では質量分析法を用いるアミノ酸配列の決定も行われてきている。質量分析法を用いるアミノ酸配列決定法は、混合物試料や微量試料にも適用可能であるという特徴を有する。

【0003】質量分析法を用いたアミノ酸配列決定においては、例えば、衝突活性化離解法(以下、CID法と記す)あるいはPost Source Decay(以下、PSD法と記す)による処理によって生じるフラグメントイオンの質量スペクトル(以下、フラグメントイオンを取得する方法をMS/MS法と、フラグメントイオンの質量スペクトルをMS/MSスペクトルとそれぞれ記す)を取得し、このスペクトルを解析してアミノ酸配列を決定することが行われている。一般にこの方法によってMS/MSスペクトルが得られるのは分子量が約3000程度以下であるため、それを越える高分子量物では通常、化学的または生化学的手段によって切断して分子量3000程度以下のペプチドにした後、適用される。

【0004】MS/MS法によってペプチドは主に主鎖部分で解離が起こり、該ペプチドのN末端を含むフラグメントイオンとC末端を含むフラグメントイオンが生成する(Methods in Enzymology, 193 (1990))。得られるMS/MSスペクトルには、N末端を含むフラグメントイオンピークとC末端を含むフラグメントイオンピークとが混在しており、解析に多大な労力を要するという問題があった。N末端を含むフラグメントイオンとC末端を含むフラグメントイオンを区別する方法として、例えば、 $H_2^{18}O$ を含む溶液中で酵素により加水分解を行うことによって、断片化された各ペプチドのC末端を ^{18}O で標識し、 ^{18}O 標識されたペプチドと ^{18}O 標識していないペプチドのMS/MSスペクトルを比較する方法が報告されている(RAPID COMMUNICATION IN MASS SPECTROMETRY, Vol. 5, pp312-315 (1991))。しかしながらこの方法では加水分解による断片化を行うことが必須であるため、ペプチド全長の配列を決定するためには煩雑な工程を経ることが必要であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ペプチドのアミノ酸配列を効率的に決定する方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】このような状況下、本発明者らはペプチドのアミノ酸配列の決定方法につき検討した結果、フラグメントイオンの質量スペクトル取得に先立ち、被検ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化することにより極めて効率的にペプチドのアミノ酸配列を決定できることを見出し、本発明に至った。すなわち本発明は、(1) ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程、(2) 該重水素標識化ペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルを取得する工

程及び、(3) (2)の工程で得られた質量スペクトルデータからペプチドのN末端アミノ基由来データおよびC末端カルボキシル基由来データを特定し、それぞれのアミノ酸配列を解析し、ペプチドのアミノ酸配列を決定する工程を含むことを特徴とするペプチドのアミノ酸配列の決定方法に関するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、ペプチドとは、2個以上の α -アミノ酸がペプチド結合により結合したものを言い、通常はアミノ酸数が約50以下である。また、タンパク質とは、 α -アミノ酸がペプチド結合により連結したポリペプチド鎖からなる高分子化合物を言い、通常は分子量約4000以上である。

【0008】本発明において、通常は分子量3000程度以下のペプチドが用いられ、高分子のペプチドやタンパク質を予め切断することにより分子量を3000程度以下としたペプチドを用いることもできる。タンパク質の切断方法は特に限定されず、例えば、A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Second Edition, Academic Press, (1993)やMethods in Enzymology, 193, 389-412, (1990)等に記載の化学的切断方法、消化酵素を用いた生化学的切断方法等をあげることができる。具体的に化学的切断方法としては例えば、BrCNによる切断方法が挙げられ、消化酵素による生化学的切断方法としては、トリプシン、キモトリプシンなどを用いた消化をあげることができる。

【0009】また、ペプチドを例えばヨードアセトアミドや4-ビニルピリジンなどにより予め還元Sアルキル化処理を行っておくことが実用上好ましい。この処理によりペプチドを構成するアミノ酸としてシステインを含む場合の副反応が抑えられる。この還元Sアルキル化処理自体は公知であり、例えば、A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Second Edition, Academic Press, (1993)等に記載の方法に準じて行うことができる。また、ペプチドを前記したタンパク質の切断により得る場合には、タンパク質の切断の前に還元Sアルキル化処理を行ってもよい。

【0010】(i) ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識する工程

ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識する方法としては、ペプチドに重水素含有アシル化剤を作用させてN末端に重水素含有アシル基を導入する方法、ペプチドに重水素含有イソシアネートを作用させてN末端に重水素含有カルバモイル基を導入する方法、ペプチドに重水素含有イソチオシアネートを作用させてN末端に重水素含有チオカルバモイル基を導入する方法等をあげることができる。ここでペプチドのN末端に導入される重水素含有アシル基、重水素含有カルバモイル基、重水素含有チオカルバモイル基等の重水素標識化のための置換基（以

下、重水素置換基と記す。)において、重水素置換基内の重水素原子が溶媒等により容易には水素と置換しないことが好ましく、この点からは重水素原子は重水素置換基の炭素原子に接続していることが好ましい。かかる重水素置換基としては、例えば $-COCD_3$ 基、 $-COCD_2H$ 基、 $-COCDH_2$ 基、 $-CONHCD_3$ 基、 $-CON(CD_3)_2$ 基、 $-CONHCD_2H$ 基、 $-CONHCDH_2$ 基、 $-CONHC(D_3)_2$ 基、 $-CONHC(D_3)H$ 基、 $-CSNHCD_3$ 基等を挙げることができる。また、該ペプチドのN末端アミノ基の重水素標識化は全てのペプチドで行うのではなく、その一部で行うことが好ましく、この部分重水素標識化における重水素標識化されていないN末端は重水素置換基に対応した重水素を含有していない置換基（以下、軽水素置換基と記す。例えば、 $-COCD_3$ 基、 $-COCD_2H$ 基及び $-COCDH_2$ 基に対応する $-COCH_3$ 基がこれに当る。）で同様に置換されている。従ってペプチドのN末端アミノ基の重水素標識化は通常、重水素置換基導入剤と軽水素置換基導入剤との混合物をペプチドに作用させることにより行われる。

【0011】ペプチドに、重水素置換基導入剤と軽水素置換基導入剤の混合物を作用させて、N末端アミノ基を重水素標識化すると、N末端に軽水素置換基が導入されたペプチドと、重水素置換基が導入されたペプチドの2種類の分子種が得られる。これらは、N末端における重水素の数だけ質量に違いが生じる。

【0012】重水素置換基中の重水素の数は1個以上あれば良いが、解析上2個～5個程度が望ましい。重水素置換基導入剤と軽水素置換基導入剤のモル比は解析を行う上では、1/1程度が望ましい。

【0013】ペプチドのN末端アミノ基を重水素標識化する工程において、ペプチドに、pH5以下で一般式

〔1〕

$(R^1CO)_2O$ 〔1〕

(式中、 R^1 はアルキル基を表わす。但し、 R^1 における水素原子の少なくとも1個は重水素原子で置換されている。)で示される重水素カルボン酸無水物と一般式

〔2〕

$(R^2CO)_2O$ 〔2〕

(式中、 R^2 はアルキル基を表わす。但し、 R^2 における水素原子は重水素原子で置換されていない。)で示される軽水素カルボン酸無水物との混合物を作用させるか、pH6以下で一般式〔3〕

R^3NCO 〔3〕

(式中、 R^3 は置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、 R^3 における水素原子の少なくとも1個は重水素で置換されている。)で示される重水素イソシアネート化合物と一般式〔4〕

R'NCO (4)

(式中、R'は置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基を表わす。但し、R'における水素原子は重水素原子で置換されていない。)で示される軽水素イソシアネート化合物との混合物を作用させることにより、ペプチドに対する重水素カルボン酸無水物と軽水素カルボン酸無水物との混合物あるいは重水素イソシアネート化合物と軽水素イソシアネートとの混合物の使用量を厳密に制御しなくとも、比較的広い範囲でε-アミノ共存下においてもN末端に極めて選択性よく目的とする置換基を導入することができる。

(1)-2 ペプチドへのカルボン酸無水物またはイソシアネート化合物処理工程

i) 重水素カルボン酸無水物〔1〕と軽水素カルボン酸無水物〔2〕との混合物処理

ペプチドにpH5以下で重水素カルボン酸無水物〔1〕と軽水素カルボン酸無水物〔2〕との混合物(以下、単にカルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕と記す場合がある。)を作用させることにより、N末端アミノ基が選択的に使用するカルボン酸無水物混合物に対応したアシル基で置換されたペプチドが得られる。使用するカルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕中の重水素カルボン酸無水物〔1〕の割合により、該アシル基中の重水素含有アシル基の割合が決まることとなる。重水素カルボン酸無水物〔1〕におけるR'は直鎖または分岐アルキル基であり、好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のC1~6の直鎖または分岐アルキル基を挙げることができ、具体的には、無水酢酸、プロピオン酸無水物、酪酸無水物、吉草酸無水物等を挙げることができる。但し、該直鎖または分岐アルキル基において水素原子のうち少なくとも1個は重水素で置換されている。また、軽水素カルボン酸無水物〔2〕におけるR'は水素原子が重水素で置換されていない以外はR'と同じである。

【0014】本工程の反応はpH5以下、好ましくはpH2~5の範囲、さらに好ましくはpH3~5の範囲で行われる。本工程において、通常は前記pHを保持するための緩衝液を溶媒として使用する。該溶媒としては、酢酸水溶液、ギ酸水溶液、ピリジン-酢酸緩衝液、トリフルオロ酢酸水溶液等の揮発性溶媒が、後処理の簡便さの点で好ましい。通常は、本工程の反応は、ペプチドおよび該溶媒からなる溶解または懸濁液に、カルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕またはそのテトラヒドロフラン等の溶液を添加することにより行われる。反応は、選択性の点から約10℃以下で、使用する溶媒が凍らない範囲の温度で行うことが好ましい。反応時間は通常、1~60分程度である。

【0015】カルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕の反

応系内の濃度は反応系内の初期濃度として通常、pH5で反応を行う場合には、約10~30mM、pH3.3で反応を行う場合には、約60~300mM程度である。本工程において反応後、反応液からN-アシル化されたペプチドを回収する。例えば、反応液に揮発性の溶媒を用いた場合は、反応液を減圧下に留去すればよい。不揮発性の塩を含む溶媒を用いた場合には、脱塩処理を行った後溶媒を減圧留去すればよい。本工程の処理を行うことにより、N末端のみが選択的に使用するカルボン酸無水物混合物〔1〕〔2〕に対応してアシル化されたペプチドを製造することができる。

【0016】ii) 重水素イソシアネート化合物〔3〕と軽水素イソシアネート化合物〔4〕との混合物処理
ペプチドに、pH6以下で重水素イソシアネート化合物〔3〕と軽水素イソシアネート化合物との混合物(以下、単にイソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕と記す場合がある。)を作用させることにより、N末端アミノ基が選択的にカルバモイル化されたペプチドが得られる。使用するイソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕の割合により、該カルバモイル基中の重水素含有カルバモイル基の割合が決まることとなる。重水素イソシアネート化合物〔3〕におけるR'は、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基である。置換されていてもよいアルキル基としては、例えばフッ素原子、塩素原子、臭素原子、よう素原子等のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル基を挙げることができ、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のC1~6アルキル基、クロロメチル基、ヨードメチル基、ジプロモメチル基、トリフルオロメチル基、ヨードエチル基等のC1~6ハロアルキル基を挙げることができる。置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基としては、例えばフェニル基、p-クロロフェニル基、o-プロモフェニル基、2,4-ジクロロフェニル基等のハロゲン置換フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等のナフチル基、1-ヨードナフチル基、2-クロロナフチル基等のハロゲン置換ナフチル基等を挙げることができる。置換されていてもよいピリジル基としては、例えば2-ピリジル基、3-ピリジル基、4-ピリジル基等のピリジル基や、2-クロロ-4-ピリジル基、3,5-ジフルオロ-2-ピリジル基等のハロゲン置換ピリジル基を挙げることができる。但し、前記した置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいナフチル基または置換されていてもよいピリジル基において水素原子のうち少なくとも1個は重水素で置換されている。重水素イソシアネート化合物〔3〕としては具体的には、フェニルイソシアネート、p-クロロフェニルイソシアネート、1-ナフチルイソシアネー

ト、2-ナフチルイソシアネート、ブチルイソシアネート、エチルイソシアネート、4-ピリジルイソシアネート、3-ピリジルイソシアネート等を挙げることができる。また、軽水素イソシアネート化合物〔4〕におけるR'は水素原子が重水素で置換されていない以外はR'と同じである。本工程の反応はpH6以下で行われ、好ましくはpH約3~6の範囲、さらに好ましくはpH約5~6で行われる。

【0017】本工程において、通常は前記pHを保持するための緩衝液を溶媒として使用する。該溶媒としては、酢酸水溶液、ギ酸水溶液、ピリジン-酢酸緩衝液、トリフルオロ酢酸水溶液等の揮発性溶媒が、後処理の簡便さの点で好ましい。通常は、本工程の反応は、ペプチドおよび該溶媒からなる溶解または懸濁液に、イソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕またはそのテトラヒドロフラン等の溶液を添加することにより行われる。反応は、例えば使用する溶媒が凍らない程度の低温から50℃程度の範囲を挙げることができる。反応時間は通常、1~60分程度である。イソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕の反応系内の濃度は反応系内の初期濃度として通常、pH6で反応を行う場合には、約2~300mM程度である。

【0018】本工程の反応後、反応液からN-カルバモイル化されたペプチドを回収する。例えば、反応液に揮発性の溶媒を用いた場合は、反応液を減圧下に留去すればよい。不揮発性の塩を含む溶媒を用いた場合には、脱塩処理を行った後、溶媒を減圧留去すればよい。本工程の処理を行うことにより、N末端のみが選択的に使用するイソシアネート化合物混合物〔3〕〔4〕に対応してカルバモイル化されたペプチドを製造することができる。

【0019】(2) (1)の工程後におけるペプチドについて、フラグメントイオンの質量スペクトルデータを取得する工程

(1)の工程後の反応生成物であるペプチドは通常、軽水素置換基導入剤でN末端アミノ基が修飾されたペプチドと、重水素置換基導入剤でN末端アミノ基が修飾されたペプチドとの質量数の違う2種類の分子種が含まれることとなる。反応生成物の質量スペクトルを測定すると、N末端における対応する軽水素置換基に対する重水素置換基の重水素の数だけ質量差に違いが生じた2本のピークを生じることとなる。これら2本のピークのMS/MSスペクトルデータをそれぞれ取得する。2本のピークを同時に一つのMS/MSスペクトルデータとして取得することもできる。MS/MSスペクトルの取得の方法としては、ペプチドを主鎖部分で開裂させた質量スペクトルを分析できる方法であればよく、質量分析装置の種類、イオン化法、ペプチドのフラグメント化方法は特に限定されない。例えば、最新のマスマススペクトロメトリー（化学同人）、Methods in Enzymology, 270, 453-586 (1996)等

に記載の質量分析装置、イオン化法、ペプチドのフラグメント化方法を使用することができる。例えば、質量分析装置としてはイオントラップ質量分析計、四重極型質量分析計、磁場型質量分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換型質量分析計などを挙げることができ、イオン化法としてはエレクトロスプレーイオン化法（ESI法）、MALDI法、FAB法などが挙げられる。ペプチドのフラグメント化方法としてはCID法、PSD法などによる処理が挙げられる。

10 【0020】(3) (2)の工程で得られた質量スペクトルデータからペプチドのN末端アミノ基由来データおよびC末端カルボキシル基由来データを特定し、それぞれのアミノ酸配列を解析し、ペプチドのアミノ酸配列を決定する工程

(2)の工程で得られたペプチドのMS/MSスペクトルデータにおいて、軽水素カルボン酸無水物〔2〕や軽水素イソシアネート化合物〔4〕等の軽水素置換基導入剤によりN末端アミノ基が修飾された分子種と、重水素カルボン酸無水物〔1〕や重水素イソシアネート化合物〔3〕等の重水素置換基導入剤によりN末端アミノ基が修飾された分子種の違いは、N末端における置換基（軽水素置換基と重水素置換基）の質量差だけである。従って、N末端を含むフラグメントイオンのみが、ペプチドに含まれる重水素置換基における重水素の数だけ質量差を生じることになる。2つの分子種のMS/MSスペクトルを別々に取得した場合には、これら2組のスペクトルデータを比較し、質量変化していないフラグメントイオンのピークを特定することにより、これをC末端カルボキシル基由来のフラグメントイオンと判定でき、重水素の数だけ質量変化があるフラグメントイオンのピークを特定することにより、これをN末端アミノ基由来のフラグメントイオンと判定できる。2つの分子種を同時にMS/MSスペクトルを取得した場合には、該MS/MSスペクトルデータ上で重水素の数だけ質量変化がある二重になったフラグメントイオンのピークを特定することにより、これをN末端アミノ基由来のフラグメントイオンと判定でき、該質量変化のないフラグメントイオンのピークを特定することにより、これをC末端カルボキシル基由来のフラグメントイオンと判定できる。

40 【0021】このようにして特定されたペプチドのC末端カルボキシル基由来のフラグメントイオンデータとN末端アミノ基由来のフラグメントイオンデータをそれぞれ、例えばMethods in Enzymology, 193 (1990)に記載の方法によりMS/MSスペクトルデータ上で質量の順にたどり、その質量差からアミノ酸の特定及びその配列順序を解析することができ、これらの結果から、ペプチドのアミノ酸配列を決定することができる。もちろんいずれか一方のみを解析することによってもペプチドのアミノ酸配列を決定することは多くの場合可能であるが、N末端アミノ基由来のフラグメントイオンデータより求めら

れるアミノ酸配列とC末端カルボキシル基由来のフラグメントイオンデータより求められるアミノ酸配列の両者を解析することにより、より正確にペプチドのアミノ酸配列を決定することができ、特に、ある特定部分のフラグメントイオンが検出されない等により、N末端アミノ基由来、C末端カルボキシル基由来のいずれか一方の解析ではアミノ酸配列の決定が困難となり得る場合により効果的に目的が達せられるので、ペプチドの確実なアミノ酸配列決定が図れることとなる。

【0022】

【実施例】以下、本発明を参考例および実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

(1) ヒト成長ホルモンのトリプシン消化物の調製
組換えヒト成長ホルモン (hGH) 200 μ g を1%炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH7.9) 200 μ L に溶解し、トリプシンを4 μ g 添加して、37℃、24時間反応させた。

【0023】 (2) N末端選択的アセチル化

前記hGHトリプシン消化物1 μ g 相当量を減圧濃縮し、残渣に0.1%酢酸水溶液 (pH 3.3) を12 μ L 加えて溶解し、氷上で1分間インキュベートした後、無水酢酸と無水酢酸-d6 (無水酢酸の水素原子が全て重水素置換されたもの) との1:1で混合し、これを無水テトラヒドロフランで1Mに調製した試薬を5 μ L 添加して氷中で5分間インキュベートした。該反応液からの溶媒を減圧下に溜去し、残渣を質量分析用試料とした。

【0024】 (3) MS/MSスペクトルの取得

MS/MSスペクトルの取得は、ThermoQuest社のイオントラップ型質量分析計LCQで行った。(2)の工程で得られた質量分析用試料を10 μ L の溶媒 (酢酸/水/メタノール=0.1/50/50) に溶解し、1 μ L をNanospray用チップに入れ、Nanosprayイオン源 (Protana社製) に装着した。エレクトロスプレー電圧を0.7kV、キャピラリー温度を120℃に設定してエレクトロスプレーマスペクトルおよびMS/MSスペクトルをそれぞれ取得した。

【0025】 (4) アミノ酸配列解析

hGHトリプシン消化物のうちのペプチドSNLELLR (MW843.5) の解析を例にする。無水酢酸-d6を含む無水酢酸でアセチル化処理したhGHトリプシン消化物試料のマスペクトルを取得すると、本消化断片は、水素からなる試薬でアセチル化された反応物ピークm/z886.5と、重水素からなる試薬でアセチル化された反応物ピークm/z889.5が検出された。これらの2本のピークm/z886.5とm/z889.5

のMS/MSスペクトルを一度に同時に取得した (図1)。MS/MSスペクトル中から質量差が3Daある*を付けた二重のピークを特定することができ、これらはN末端由来のフラグメントイオンであることがわかった。これらのフラグメントイオン (*) の質量差を読み取ることにより、 $\rightarrow E \rightarrow I/L \rightarrow I/L \rightarrow R$ という配列が確認できた (ここで、IとLとは分子量が同じであるためいずれかを特定できないので、I/Lと記載する。以下同様。)。一方、3Daの質量差がある二重のピーク以外の一重のピークは、C末端由来のフラグメントイオンであることがわかり、質量差を読み取ることによりAc-Ser \rightarrow N \rightarrow I/L \rightarrow E \rightarrow という配列を確認できた。以上の結果から、hGHトリプシン消化物に含まれるペプチドをアミノ酸配列SN(I/L)E(I/L)(I/L)Rと決定できた。

【0026】 参考例1

ペプチドとしてダイノルフィンA (アミノ酸配列: YGGFLRRIRPKLKWDNQ、ペプチド研究所製) 100pmolを0.1Mピリジン-酢酸 (pH6.0)、0.1Mピリジン-酢酸 (pH5.0)、0.1%酢酸水溶液 (pH3.3) および1%酢酸水溶液 (pH2.7) 各12 μ L にそれぞれ溶解し、氷上で1分間インキュベートした後、0.005M~5Mの無水酢酸/無水テトラヒドロフランを5 μ L 添加し、氷上で5分間インキュベートした。該反応液から溶媒を減圧下に溜去し、残渣を質量分析用試料とした。質量分析は二重収束型質量分析計 (日本電子、型式JMS-HX/HX110A) を使い、FABイオン化法を使用した。上記質量分析用試料を水・メタノール・酢酸 (50・50・1) 2 μ L に溶解し、該試料溶液1 μ L をグリセロール・チオグリセロール (1・1) 1 μ L と混合して上記分析計に供し、FAB-MSおよびFAB-MS/MS測定を行った。無水酢酸処理後に原料のダイノルフィンAに比し質量が42増加したピークについてMS/MS分析を行ったところ、N末端 α -アミノ基のみがアセチル化されたダイノルフィンAであることが確認できた。各pHおよび無水酢酸量条件におけるN末端のみアセチル化されたダイノルフィンAの選択率を表1に示す。

【0027】 表1中の記号の説明

N末端のみアセチル化されたダイノルフィンAの選択率

◎: 75%超

○: 70%超75%以下

△: 60%超70%以下

×: 60%以下

【0028】

【表1】

反応 pH	無水酢酸添加量 (添加した無水酢酸 / THF 5・k 中の無水酢酸のモル濃度 (mM) として表示する)							
	10	20	40	100	200	500	1000	2000
6.0	△	○	△	×	×	×	×	×
5.0	×	×	◎	◎	△	×	×	×
4.5	×	×	○	◎	○	×	×	×
3.3	×	×	×	×	◎	◎	◎	×

重水素置換体も化学的性質は同様であるため、本参考例と同様にしてN末端アミノ基をCD₃CO基により重水素標識化できる。

【0029】参考例2

参考例1において無水酢酸に代えて表2に記載のイソシ

アネート化合物〔2〕を用い、表2に記載した条件とした以外は参考例1と同様に実験を行った。結果を表2に示す。

【0030】

【表2】

反応 pH	イソシアネート化合物	温度	添加量*1	選択率*2
6.0	7-エチルイソシアネート	0℃	10 mM	◎
6.0	7-エチルイソシアネート	0℃	100 mM	◎
6.0	7-エチルイソシアネート	25℃	100 mM	◎
6.0	n-7-チルイソシアネート	25℃	100 mM	◎
6.0	n-7-チルイソシアネート	25℃	1000 mM	◎
5.0	7-エチルイソシアネート	0℃	100 mM	◎
3.3	7-エチルイソシアネート	0℃	100 mM	◎

*1：シアネート化合物の添加量を添加したシアネート化合物 / THF 5 μL 中のシアネート化合物のモル濃度 (mM) として表示する。

*2：N末端のみカルバモイル化されたダイノルフィンAの選択率

重水素置換体も化学的性質は同様であるため、同様にしてN末端アミノ基にC₆D₅NHCO基またはCD₃C₆H₄NHCO基により重水素標識化できる。

【0031】

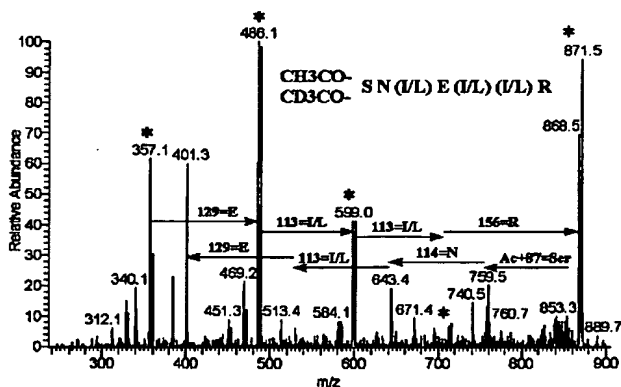
【発明の効果】本発明によれば、ペプチドのアミノ酸配列を極めて効率的に決定することが可能な方法を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1におけるhGHトリプシン消化物のアセチル化処理試料のマススペクトルにより得られたアセチル化されたピーク (m/z 886.5と889.5) のMS/MSスペクトルを示す。

*印は、3Daの質量差がある二重フラグメントピークを示す。S、N、I/L、E、Rはそれぞれフラグメントイオンピークの質量差から求められるアミノ酸残基を示し、Sはセリン残基を、Nはアスパラギン残基を、I/Lはイソロイシン残基またはロイシン残基を、Eはグルタミン酸残基を、Rはアルギニン残基を表わす。また、Acはアセチル基を表す。

【図1】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.